

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL
DAUN WARU LANDAK (*Hibiscus mutabilis* L.)
TERHADAP *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*
SERTA *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST***

SKRIPSI



Oleh :

**ASRI SUBEKTI
K 100 040 046**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2009**

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Penyakit infeksi dan penyakit kanker merupakan salah satu masalah dalam bidang kesehatan yang dari waktu ke waktu yang terus berkembang. Infeksi merupakan penyakit yang dapat ditularkan dari satu orang ke orang lain atau dari hewan ke manusia. Infeksi disebabkan oleh berbagai mikroorganisme seperti bakteri, virus, riketsia, jamur, dan protozoa. Organisme-organisme ini dapat menyerang seluruh tubuh atau sebagian daripadanya (Gibson, 1996).

Pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun waru landak menggunakan metode dilusi padat. Pada pengujian ini digunakan bakteri *Staphylococcus aureus* yang merupakan bakteri Gram positif dan bakteri *Escherichia coli* yang merupakan bakteri Gram negatif (Pelczar dan Chan, 1986). *S. aureus* merupakan patogen, seperti bisul dan beberapa infeksi lainnya (radang paru-paru, radang kelenjar dada, radang urat darah, meningitis, saluran kencing osteomyelitis, dan endocarditis). Infeksi *S. aureus* menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda yang khas, yaitu peradangan, nekrosis dan pembentukan abses. Sedangkan *E. coli* dapat menyebabkan infeksi primer pada usus (Warsa, 1994). *E. coli* merupakan patogen berbahaya yang menyebabkan penyakit diare dan sindrom diare lanjutan serta hemolitik uremic (Anonim, 2008).

Sedangkan penyakit kanker adalah suatu penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan sel-sel jaringan yang tidak normal, cepat, dan tidak terkendali. Usaha pengobatan medis yang sering dilakukan seperti pembedahan, radiasi, pemberian obat antikanker, kemoterapi, imunoterapi, dan pengobatan dengan hormon tertentu hingga saat ini belum memberikan hasil yang memuaskan. Hal ini antara lain disebabkan oleh rendahnya selektivitas obat antikanker yang digunakan atau karena patogenitas kanker itu sendiri belum jelas benar (Meiyanto dan Sugiyanto, 1997).

Banyaknya pilihan untuk pengobatan kanker membuat sebagian orang lebih menyukai pengobatan tradisional menggunakan bahan alam tanaman berkhasiat. Obat tradisional adalah bahan atau ramuan bahan berasal dari tumbuh-tumbuhan, hewan, mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut yang secara turun-temurun telah digunakan untuk pengobatan. Selanjutnya digunakan istilah obat tradisional meskipun istilah jamu jauh lebih memasyarakat di Indonesia. Obat tradisional mempunyai beberapa keuntungan antara lain obat bebas yang dapat diperoleh tanpa resep dokter, dapat diramu sendiri oleh yang memerlukan, bahan baku obat tradisional tidak perlu diimport, tanaman obat dapat ditanam di sekitar tempat tinggal (Anonim, 2000).

Salah satu tanaman obat yang dapat digunakan sebagai obat tradisional adalah waru landak. Waru landak (*Hibiscus mutabilis* L.) adalah salah satu anggota famili Malvaceae yang khasiatnya sebagai antimikroba, antiradang, membersihkan darah, antibengkak, melancarkan pengeluaran nanah, antineoplastik, menghentikan pendarahan (koagulan). Efek bahan obat alam erat hubungannya dengan senyawa kimia yang terkandung di dalamnya. Pada bunga mengandung antosianin,

isokuersitrin, hiperin, hiperosida, rutin, kuersetin-4-glukosida, spiraeoside, kuersimeritrin, sianidin 3,5-diglukosida, sianidin 3-rutinosida-5-glukosida. Sedangkan daunnya mengandung tanin dan fenolik. Bunganya berkhasiat sebagai antikanker esofagus, kardial, lambung, paru-paru, payudara dan kulit (Dalimarta, 2004).

Pemanfaatan tanaman waru landak antara lain sebagai tanaman obat antikanker dan antimikroba yang masih berdasarkan pengalaman para pengguna semata, sehingga harus dibuktikan secara ilmiah. Berdasarkan hal tersebut, dilakukan serangkaian penelitian farmakologi terhadap ekstrak tanaman waru landak yang mencakup penelitian uji toksisitas dan uji aktivitas antibakteri.

Tanaman waru landak memiliki aktivitas antimikroba, aktivitas ini berkaitan dengan toksisitas (kandungan racun) tanaman yang cukup tinggi sebagai suatu bentuk mekanisme pertahanan diri. Dari sejumlah pengalaman eksperimental terbukti pula bahwa sebagian tanaman yang memiliki aktivitas antimikroba pada umumnya juga menunjukkan potensi sebagai suatu antikanker. Penelitian yang telah dilakukan hingga saat ini menyatakan bahwa toksisitas tanaman berkaitan dengan kandungan senyawa kimia yang terkandung didalamnya (Anonim, 2008).

Salah satu metode uji toksisitas ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST). Metode BST dapat dilakukan dengan tepat, cepat, dan murah. Metode ini menggunakan hewan uji *Artemia salina* Leach. Hasil uji dinyatakan sebagai LC_{50} , bila harga LC_{50} kurang dari 1000 $\mu\text{g/mL}$ dinyatakan toksik dan berpotensi sebagai antikanker (Meyer *et al.* , 1982).

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas maka dapat dirumuskan suatu permasalahan sebagai berikut :

1. Berapa konsentrasi bunuh minimum ekstrak etanol daun waru landak terhadap *S. aureus* dan *E. coli* ?
2. Berapa nilai LC_{50} ekstrak etanol daun waru landak terhadap *Artemia salina* Leach?
3. Senyawa kimia apa saja yang terdapat di dalam ekstrak etanol daun waru landak?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak etanol daun waru landak terhadap *S. aureus* dan *E. coli*.
2. Menentukan LC_{50} ekstrak etanol daun waru landak terhadap *Artemia salina* Leach.
3. Mengetahui senyawa kimia yang terdapat di dalam ekstrak etanol daun waru landak dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

D. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman Waru Landak (*Hibiscus mutabilis* L.)

Klasifikasi lengkap tanaman *Hibiscus mutabilis* L. adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Subclass	: Dilleniidae
Ordo	: Malvales
Famili	: Malvaceae
Genus	: Hibiscus
Species	: <i>Hibiscus mutabilis</i>

(Anonim, 2007)

Hibiscus mutabilis L., mempunyai nama yang berbeda di setiap daerah, antara lain : waru landak (Jawa), bunga waktu besar (Maluku), saya ngali-ngali (Ternate).

Morfologi dari *Hibiscus mutabilis* L., perdu tegak, tinggi sekitar 2-5 m, dengan beberapa percabangan, dan berambut halus. Daun tunggal, bertangkai dengan panjang 5–8 cm, letak berseling. Helaian daun besar, bercangap menjari 3–5 , ujung runcing, pangkal berlekuk, tepi bergerigi, panjang daun 10–20 cm, lebar 9–22 cm, kedua permukaan daun dilapisi rambut halus. Bunga besar dengan diameter 7–10 cm, keluar dari ketiak daun atau berkumpul di ujung tangkai. Pagi

hari berwarna putih atau dadu, sore hari menjelang layu berubah menjadi merah. Buah bulat, diameter 2–5 cm, dipenuhi rambut kasar, biji berlekuk (Dalimarta, 2004).

Waru landak biasanya ditanam di taman, di halaman rumah sebagai tanaman pagar, atau tumbuh liar di hutan dan ladang. Tanaman ini biasa ditemukan pada ketinggian 1-900 m dpl (Dalimarta, 2004).

Bagian tanaman bermanfaat yang sebagai obat adalah bunga, daun, dan akar untuk mengatasi berbagai penyakit. Lendir dari daun digunakan oleh penduduk untuk melunakan dan mematangkan bisul yang keras (Dalimarta, 2004).

Kandungan senyawa kimia metabolit sekunder tumbuhan famili Malvaceae beraneka ragam. Pada bunga mengandung antosianin, isokuersitrin, hiperin, hiperosida, rutin, kuersetin-4-glukosida, spiraeosida, kuersimeritrin, sianidin 3,5-diglukosida, sianidin 3-rutinosida-5-glukosida. Daunnya mengandung tanin, fenol, asam amino, dan penurun kadar gula (Dalimarta, 2004).

Herba waru landak berkhasiat sebagai antimikroba, antiradang, pembersih darah, menghilangkan bengkak, melancarkan pengeluaran nanah, dan menghentikan pendarahan (hemostatik) (Dalimarta, 2004).

2. Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan padat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa

diperlakukan sedemikian rupa sehingga memenuhi baku yang ditentukan (Anonim, 1995).

Ekstraksi merupakan pemindahan massa zat yang semula berada di dalam sel, ditarik oleh cairan penyari sehingga terjadi pemindahan larutan zat aktif ke dalam cairan penyari (Anonim, 1986).

Metode penyarian yang digunakan tergantung dari wujud dan kandungan zat dari bahan tumbuhan yang diekstraksi dan serta jenis senyawa yang diisolasi (Voight, 1994).

Ragam ekstraksi yang tepat sudah tentu bergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi. Jumlah dan jenis senyawa yang dapat dipisahkan menjadi fraksi yang berbeda sudah tentu berbeda, bergantung pada jenis tumbuhan (Harborne, 1987). Cara penyarian dapat dibedakan menjadi infundasi, maserasi, perkolasi, dan soxhletasi (Anonim, 1986).

Biasanya metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat dari bahan mentah obat dengan tiap macam metode ekstraksi dan kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna atau mendekati sempurna dari obat. Sifat dari bahan mentah obat merupakan faktor utama yang harus dipertimbangkan dalam memilih metode ekstraksi (Ansel, 1989).

a. Metode Infundasi

Proses penyarian yang umumnya digunakan untuk menyari zat kandungan aktif yang larut dalam air dan bahan-bahan nabati. Infus adalah sediaan cair

yang dibuat dengan menyari simplisia menggunakan air pada suhu 90°C selama 15 menit (Anonim, 1986).

b. Metode Maserasi

Istilah *maceration* berasal dari bahasa Latin *macerare*, yang artinya merendam. Maserasi merupakan proses penyarian dengan cara serbuk direndam dalam pelarut sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat yang mudah larut akan melarut (Ansel, 1989).

Lamanya waktu maserasi berbeda-beda tergantung pada sifat atau ciri campuran serbuk dan pelarut. Lamanya harus cukup supaya dapat memasuki semua rongga dari struktur serbuk dan melarutkan semua zat yang mudah larut. Lamanya maserasi bisa memerlukan waktu beberapa jam atau beberapa hari untuk ekstraksi yang optimum. Maserasi biasanya dilakukan pada temperatur 15°C – 20°C dalam waktu selama 3 hari sampai bahan-bahan yang larut, melarut (Ansel, 1989).

c. Metode Perkolasi

Istilah *perkolasi* berasal dari bahasa Latin *per* yang artinya melalui dan *colare* yang artinya merembes, secara umum dapat dinyatakan sebagai proses dimana serbuk simplisia yang sudah halus, zat yang larutnya diekstraksi dalam pelarut yang cocok dengan cara melewati perlahan-lahan melalui serbuk simplisia dalam suatu kolom. Serbuk simplisia dimampatkan dalam alat ekstraksi khusus disebut perkulator (Ansel, 1989).

d. Metode Soxhletasi

Soxhletasi merupakan penyarian dengan cara yaitu bahan yang akan diekstraksi diletakkan dalam sebuah kantung ekstraksi (kertas atau karton) di bagian dalam alat ekstraksi dari gelas yang bekerja kontinyu. Wadah gelas yang mengandung kantung diletakkan di antara labu penyulingan dengan pendinginan aliran balik dan dihubungkan dengan labu melalui pipa labu tersebut berisi bahan pelarut dan mencapai ke dalam pendingin aliran balik melalui sifon, berkondensasi di dalamnya, menetes di atas bahan yang akan diekstraksi dan menarik keluar bahan yang diekstraksi, lalu berkumpul di dalam wadah gelas dan setelah mencapai tinggi maksimalnya, secara otomatis dipindahkan ke dalam labu alas bulat. Dengan demikian zat yang terekstraksi terakumulasi melalui penguapan bahan pelarut murni berikutnya (Voight, 1994).

3. Mikrobiologi

Bakteri hidup tersebar di alam, antara lain di tanah, udara, air dan makanan. Secara garis besar bakteri dapat dibedakan atas bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri gram positif yaitu bakteri yang pada pengecatan gram tetap mengikat warna cat pertama (Gram A) karena tahan terhadap alkohol dan tidak mengikat warna cat yang kedua (warna kontras) sehingga bakteri akan berwarna ungu. Bakteri gram negatif yaitu bakteri yang pada pengecatan gram warna cat yang pertama (Gram A) dilunturkan karena tidak tahan terhadap alkohol dan mengikat warna cat yang kedua (warna kontras) sehingga bakteri berwarna merah (Pelczar dan Chan, 1986).

Bakteri gram positif mempunyai dinding sel yang tebal (15–80 nm) dan terdiri dari lapisan peptidoglikan 40–50% , lipid 2% dan asam teikoat. Dinding sel bakteri Gram negatif sangat tipis (10–15 nm) yang terdiri dari lapisan peptidoglikan 5–20%, lipid 20%, protein, lipopolisakarida, dan lipoprotein (Suryono, 1995).

a. *Staphylococcus aureus*

1.) Klasifikasi

Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Bangsa	: Eubacteriales
Suku	: Micrococcaceae
Marga	: Staphylococcus
Jenis	: <i>Staphylococcus aureus</i>

(Salle, 1961)

2.) Morfologi dan sifat

S. aureus termasuk bakteri gram positif, berbentuk bulat, berdiameter 0,1 – 1,5 µm. *S. aureus* terdapat tunggal berpasangan dan secara khas membelah diri pada lebih dari satu bidang sehingga membentuk gerombol yang tidak teratur (Pelczar, 1986). *S. aureus* tidak bergerak, tidak berspora dan positif Gram. Bakteri ini mulai tumbuh pada berbagai pembenihan atau metabolisme yang aktif, meragikan banyak karbohidrat yang lambat, menghasilkan asam laktat tetapi tidak menghasilkan gas dari meragikan

pigmen yang bervariasi dari putih sampai kuning tua. *Staphylococcus* patogen sering menghemolisis darah dan mengkoagulasi plasma, beberapa diantaranya tergolong flora normal kulit dan selaput lendir manusia (Jawetz *et al.*, 1982).

Pertumbuhan terbaik dan khas pada bakteri ini adalah suasana aerob, bakteri ini pun bersifat anaerob fakultatif dan dapat tumbuh dalam udara yang hanya mengandung hidrogen dan pH optimum untuk pertumbuhan adalah 7,4. Warna khas ialah kuning keemasan, hanya intensitas warnanya dapat bervariasi (Warsa, 1994).

Koloni pada pembenihan padat terbentuk bulat, halus, menonjol dan berkilau membentuk pigmen. Bahan yang terkontaminasi dengan flora campuran dapat ditanam dalam pembenihan yang mengandung 7,5–10% HCl (Bonang dan Koeswardono, 1982).

Media differensial yang digunakan untuk mengidentifikasi *S. aureus* adalah VJA (Vogel Jhonson Agar) dengan penambahan kalium telurit 1%. Kandungan dari medium VJA adalah pepton dan kasein, ekstrak ragi, D(–) manitol, dikalium hidrogen fosfat, klorida lithium, glisin, *phenol red* dan agar. Medium ini sebelum digunakan berwarna merah orange. Hasil pengujian ditunjukkan warna koloni hitam dan warna medium di sekitar koloni kuning. Manitol diubah dalam suasana asam dan dengan *phenol red* sehingga warna medium di sekitar koloni kuning. Hasil koloni yang tumbuh pada media differensial dilanjutkan dengan uji katalase. Uji

katalase bertujuan untuk membedakan koloni *staphylococcus* dan *streptococcus* (Jawetz *et al.*, 1982).

3.) Toksin dan Enzim

Staphylococcus dapat menimbulkan penyakit melalui kemampuannya berbiak dan menyebar luas dalam jaringan dan melalui pembentukan banyak zat ekstra seluler (Jawetz *et al.*, 1982). Faktor-faktor patogenesis yang dihasilkan antara lain, hemolisin α , leukosidin (P-V leucocidin), eksfoluatin, enterotoksin, toksin sindrom kejutan toksik (TSST-1 toxin). *S. aureus* menghasilkan enzim-enzim antara lain, koagulase, hialuronidase, stafilokinase, nuklease, katalase, β -laktamase (Anonim, 2008). Peradangan setempat merupakan sifat khas dari infeksi bakteri *S. aureus* (Warsa, 1994).

b. *Escherichia coli*

1.) Klasifikasi

Divisi	: Protophyta
Klas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: Escherichia
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

(Salle, 1961)

2.) Morfologi dan Sifat

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang lurus, berukuran panjang 1–3 nm dan lebar 0,4–0,7 nm, bergerak dengan flagel peritrik atau tidak dapat bergerak, dan merupakan kuman perut pada bagian flora normal saluran usus dan bersifat patogen oportunis (Bonang dan Koeswardono, 1982). Sebagian besar gerak positif dan beberapa *strain* mempunyai kapsul (Karsinah dkk., 1994).

Bakteri ini membentuk koloni bundar, cembung, halus dengan tepi nyata. *E. coli* selama berada dalam usus tidak berbahaya, tetapi bila sudah berada di luar usus dan migrasi ke alat-alat tubuh lainnya, akan bersifat patogen. Media differensial untuk identifikasi *E. coli* digunakan Endo Agar dengan hasil warna koloni merah metalik, koloni kilap logam hasil warna koloni merah metalik, koloni kilap logam dan warna medium merah violet. Kandungan dari medium Endo Agar adalah pepton dari daging, laktosa, dikalium hidrogen fosfat, natrium sulfit anhidrat, fuchsin, dan agar. Warna medium sebelum digunakan adalah merah muda. Natrium sulfit dan fuchsin berfungsi sebagai penghambat pertumbuhan bakteri Gram positif (Jawetz *et al.*, 1982).

Warna koloni merah disebabkan bakteri *E. coli* dan koliform memetabolisme laktosa menjadi aldehid dan asam sehingga didehid bereaksi dengan fuchsin. Koloni kilap logam disebabkan *E.coli* bereaksi dengan fuchsin kristal sehingga fuchsin tersebut diserap. Hasil koloni yang tumbuh pada media differensial dilanjutkan uji biokimia IMVIC

dengan hasil indol positif, *methyl red* positif, Voges Proskauer dan sitrat negatif (Jawetz *et al.*, 1982; Volk dan Wheeler, 1990).

3.) Toksin dan Enzim

Faktor-faktor patogenesis yang dihasilkan dari *E. coli* adalah K1-kapsul, fimbria/pili, enterotoksin, dan verotoksin. Tempat yang paling sering terkena infeksi *E. coli* adalah saluran kemih, saluran empedu, dan tempat-tempat lain di rongga perut (Karsinah, 1994). Enterotoksin yang dihasilkan menyebabkan diare. *E. coli* memproduksi enterotoksin yang tidak tahan panas (toksin LT) dan menyebabkan diare yang ringan, sedangkan enterotoksin yang tahan panas (toksin ST) dapat menyebabkan sekresi air dan klorida ke dalam lumen usus, menghambat reabsorpsi natrium (Volk dan Wheeler, 1990). Selain itu toksin ST menurunkan motilitas usus halus (Karsinah, 1994).

c. Mekanisme Kerja Bakteri

Berdasarkan mekanisme kerja antibakteri dibagi lima kelompok yaitu menghambat sintesis dinding sel bakteri, mengganggu metabolisme sel bakteri, merusak membran sel bakteri, menghambat sintesis protein sel bakteri dan menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri. Antibakteri ada yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri, dikenal sebagai aktivitas bakteriostatik, dan ada yang bersifat membunuh bakteri dikenal sebagai aktivitas bakterisid (Ganiswara, 1995).

d. Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi (sumuran) dan metode dilusi (pengenceran). Metode dilusi atau pengenceran merupakan metode yang pengamatannya berdasarkan kekeruhan larutan. Metode ini dapat menentukan secara kuantitatif, konsentrasi suatu obat yang dapat menghambat pertumbuhan kuman. Prinsip dari cara ini adalah penghambatan pertumbuhan kuman dalam pembenihan atau media cair oleh suatu obat yang dicampurkan ke dalam medium. Pembenihan yang dipakai harus merupakan pembenihan yang dapat menumbuhkan kuman secara optimum dan tidak menetralkan obat yang digunakan (Bonang dan Koeswardono, 1982).

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dapat ditentukan dengan metode dilusi. KHM ditentukan dengan mengamati adanya kekeruhan pada seri pengenceran dari sejumlah tabung yang telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. KBM ditentukan dari batas tabung yang jernih untuk selanjutnya ditanam pada medium differensial secara goresan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri. Pada prinsipnya antibiotik diencerkan hingga memperoleh beberapa konsentrasi. Pada dilusi cair, masing-masing konsentrasi dapat ditambah suspensi kuman dalam media, sedangkan pada dilusi padat tiap konsentrasi dapat dicampur dengan media agar lalu ditanami kuman (Anonim, 1993).

4. Toksisitas

Toksisitas didefinisikan sebagai kemampuan suatu zat untuk menimbulkan keracunan. Toksisitas merupakan suatu sifat relatif dari zat kimia dan sejauh menyangkut diri manusia secara langsung atau tidak langsung. Uji toksisitas dibagi 2 golongan yaitu uji toksisitas tak khas (akut, subkronis, dan kronis) dan uji toksisitas khas yang meliputi potensi teratogenik, mutagenik, dan karsinogenik (Donatus, 1990). Uji toksisitas tak khas dirancang untuk mengevaluasi seluruh efek umum suatu senyawa pada hewan uji, sedangkan uji toksisitas khas yang dirancang untuk mengevaluasi dengan rinci tipe toksisitas spesifik (Loomis, 1978).

Uji toksisitas akut dengan hewan uji *A. salina* dapat digunakan sebagai uji pendahuluan pada penelitian yang mengarah ke uji sitotoksik, karena ada kaitan antara uji toksisitas akut dengan uji sitotoksik jika harga LC_{50} dari toksisitas akut $< 1000 \mu\text{g/mL}$ (Meyer *et al.*, 1982).

Pada hewan percobaan untuk harga LC_{50} dibedakan menjadi :

1. Toksik ($LC_{50} \leq 1000 \mu\text{g/ml}$)
2. Tidak toksik ($LC_{50} \geq 1000 \mu\text{g/ml}$)

(Meyer *et al.*, 1982)

Toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach yaitu merupakan uji toksisitas akut. Parameter yang digunakan untuk menunjukkan adanya aktivitas biologi suatu senyawa terhadap *Artemia salina* L adalah kematian. Senyawa-senyawa yang menunjukkan ketoksikan yang tinggi dalam BST sering dikaitkan dengan

potensinya sebagai antikanker. Penelitian menggunakan *Artemia salina* L sebenarnya tidak spesifik untuk antitumor atau aksi fisiologis tertentu, namun demikian jumlah yang signifikan dari sampel yang bersifat toksik terhadap *Artemia salina* L ternyata juga mempunyai aktivitas sitotoksik (Meyer *et al.*, 1982).

5. *Brine Shrimp Lethality Test* (BST)

Brine Shrimp Lethality Test (BST) merupakan salah satu metode penelitian pendahuluan terhadap adanya senyawa sitotoksik dalam ekstrak tanaman aktif (Meyer *et al.*, 1982).

Metode ini telah banyak dikembangkan sehingga salah satu cara penentuan bioaktivitas ekstrak tanaman maupun senyawa murni. Penggunaan yang luas metode ini pada mulanya adalah untuk mengetahui tingkat toksisitas suatu sediaan (Mudjiman, 1985).

Artemia atau *brine shrimp* adalah sejenis udang-udangan primitif yang termasuk dalam filum Arthropoda, mula-mula spesiesnya *Cancer salinus*, yang diberikan oleh Linnaeus tahun 1778, tetapi kemudian diubah oleh Leach pada tahun 1819 menjadi *Artemia salina* Leach. *Artemia* hidup planktonik di perairan yang berkadar garam tinggi (antara 15–300 per mil). Suhu yang dikehendaki berkisar antara 26⁰C–31⁰C dan pH antara 7,3–8,4 (Mudjiman, 1985).

a. Klasifikasi *Artemia salina* Leach

Kingdom	: Animal
Sub Kingdom	: Metazoa
Phylum	: Arthropoda
Sub Phylum	: Mandibulata
Classis	: Crustacea
Sub classis	: Branciopoda
Ordo	: Anostraca
Familia	: Artemiidae
Genus	: Artemia
Spesies	: <i>Artemia salina</i> Leach

(Mudjiman, 1991)

b. Lingkungan hidup

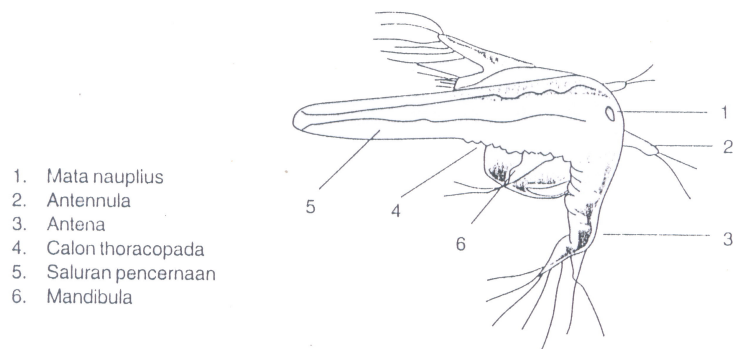
Artemia hidup secara planktonik di perairan laut yang kadar garamnya (salinitas) berkisar antara 15–300 per mil dan suhu yang berkisar antara 26°C–31°C serta nilai pH antara 7,3–8,4. Keistimewaan *Artemia* sebagai plankton adalah memiliki toleransi (kemampuan beradaptasi dan mempertahankan diri) pada kisaran kadar garam yang sangat luas. Pada kadar garam yang sangat tinggi dimana tidak ada satu pun organisme lain mampu bertahan hidup, ternyata *Artemia* mampu mentolerirnya (Siregar, 1995).

Makanan *Artemia* terdiri dari pakan alami berupa diatomae, ganggang hijau renik, bakteri dan cendawan (ragi laut) (Siregar, 1995).

c. Morfologi

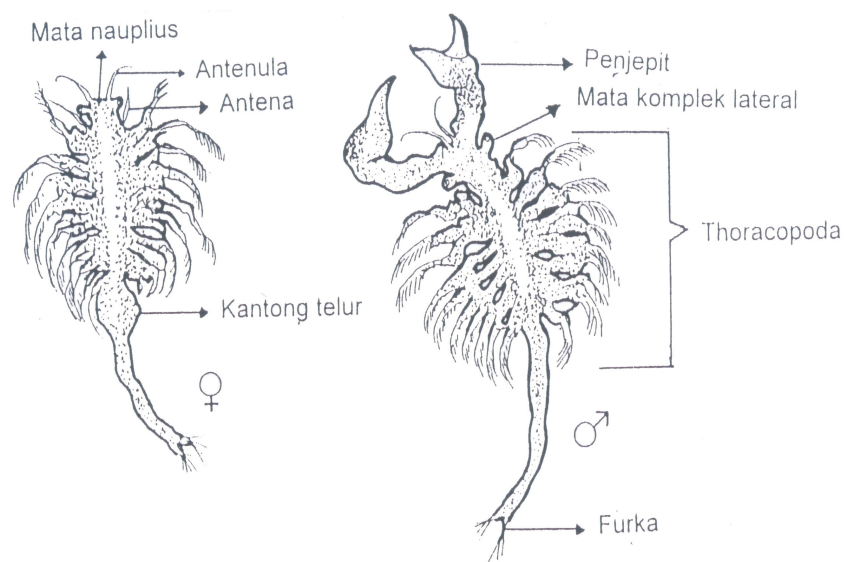
Artemia diperdagangkan dalam bentuk telur istirahat yang disebut dengan kista. Kista ini dilihat dengan mata telanjang berbentuk bulatan-bulatan kecil berwarna kelabu kecoklatan dengan diameter berkisar antara 200 – 350 mikron (Siregar, 1995).

Artemia saat menetas beratnya sekitar 15 mikrogram dan panjangnya 0,4 mm. *Artemia* yang baru menetas disebut *nauplius*, berwarna orange, berbentuk bulat lonjong. *Nauplius* berangsur-angsur mengalami perkembangan dan perubahan morfologis dengan 15 kali pergantian kulit hingga dewasa. Pada saat pergantian kulit disebut dengan *unstar*. Stadia awal saat penetasan disebut *naplius unstar* I. pada stadia *unstar* II panjangnya sekitar 0,6 mm dan pada saat stadia *unstar* III mencapai sekitar 0,7 mm (Siregar, 1995).



Gambar 1. Morfologi Nauplius *Artemia* (Mudjiman, 1992)

Artemia dewasa mencapai panjang antara 1–2 cm dan berat telur 10 mg. Telur *artemia* beratnya 3,6 mikrogram, diameternya sekitar 300 mikron. *Artemia* ditandai dengan adanya tangkai mata yang jelas terlihat pada kedua sisi kepala, antena, sebagai alat sensori, saluran pencernaan yang terlihat jelas dan 11 pasang thorakopoda. Pada *artemia* jantan, antena berubah menjadi alat penjepit, sepasang penis terdapat di bagian belakang tubuh, sedangkan pada *artemia* betina mengalami penyusutan. Sepasang indung telur terdapat di kedua sisi saluran pencernaan, di belakang thorakopoda (Siregar, 1995).



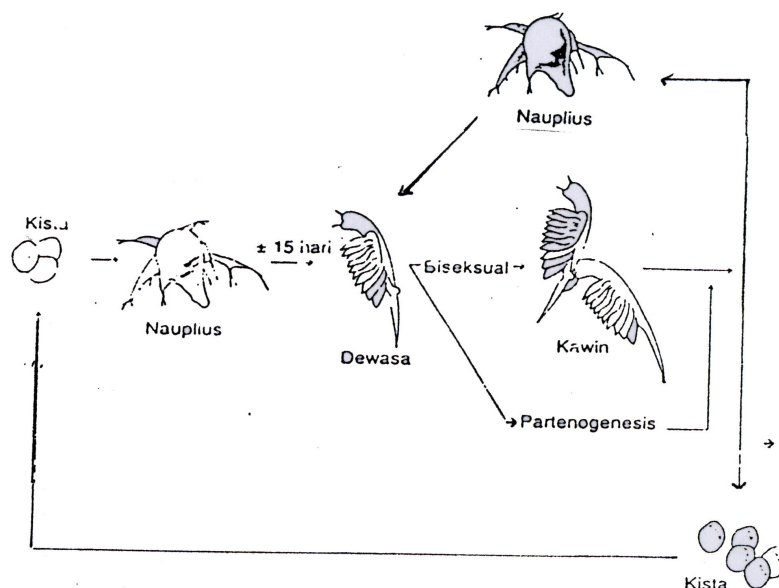
Gambar 2. Morfologi Artemia Dewasa (Mudjiman, 1992)

d. Perkembangan dan Siklus Hidup

Berdasarkan cara perkembangbiakannya ada dua golongan *Artemia* yaitu jenis biseksual dan jenis partenogenetik. Baik perkembangbiakan biseksual maupun parthenogenesis, keduanya dapat terjadi ovovivipar atau ovipar. Pada ovovivipar yang keluar dari induknya sudah berupa anak atau beranak yang

dinamakan nauplius. Sedangkan pada cara ovipar, yang keluar dari induknya berupa telur yang bercangkang tebal, yang dinamakan siste (Siregar, 1995).

Ovoviviparitas biasanya terjadi apabila keadaan lingkungannya cukup baik, dengan kadar garam kurang dari 150 per mil dan kandungan oksigennya cukup. Sedangkan oviparitas akan terjadi apabila keadaan lingkungannya memburuk, dengan kadar garam lebih dari 150 per mil dan kandungan oksigennya rendah. Telur yang bercangkang tebal itu memang disiapkan untuk menghadapi keadaan lingkungan yang buruk, bahkan juga kekeringan. Sementara itu, embrio yang berada di dalam cangkang telurnya beristirahat. Apabila keadaan lingkungannya sudah baik kembali, maka telur-telur itu akan menetas menjadi burayak, yang selanjutnya hidup normal seperti biasanya.



Gambar 3. Siklus Hidup *Artemia* (Mudjiman, 1992)

Untuk menetas telur *Artemia*, kita memerlukan wadah yang bening. Telur dapat ditetaskan dalam air laut biasa (kadar garam kira-kira 30 permil). Untuk mencapai hasil penetasan yang lebih baik, perlu penggunaan air laut berkadar 5-30 permil. Selain itu dapat pula digunakan air laut buatan (ALB).

6. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan fisika kimia. Lapisan yang memisahkan terdiri atas butir-butir (fase diam), yang ditempatkan pada penyangga berupa pelat gelas, logam atau lapisan lain yang cocok. Campuran yang akan dipisahkan berupa larutan, ditotolkan berupa bercak. Lempeng KLT yang ditotoli bercak atau lapisan diletakkan dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang sesuai (fase gerak) selama perambatan. Selanjutnya senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan (Stahl, 1985).

KLT merupakan metode pemisahan komponen-komponen atas dasar perbedaan absorpsi atau partisi oleh fase diam di bawah gerakan fase gerak atau fase gerak campuran. Pemilihan fase gerak campuran sangat dipengaruhi oleh macam dan polaritas zat-zat kimia yang dipisahkan (Mulja dan Suharman, 1995).

Fase diam yang digunakan dalam KLT adalah lapisan penjerap besar kecil dan homogen. Penjerap sangat berpengaruh dalam proses pemisahan, sebab daya lekat pada pendukung sangat ditentukan oleh kedua sifat tersebut. Besar partikel yang biasa digunakan adalah 1–25 mikron. Partikel yang butirannya sangat kasar tidak akan memberikan hasil pemisahan yang memuaskan karena itu salah satu cara untuk menaikkan hasil pemisahan adalah menggunakan penjerap yang butirannya halus. Partikel yang butirannya sangat halus akan mengakibatkan aliran pelarut

menjadi lambat, sedangkan partikel yang butirannya kasar memberikan aliran pelarut yang lebih cepat (Sastrohamijoyo, 1991).

Empat yang paling umum dipakai: silika gel (asam silikat), alumina (aluminium oksida), diatome, dan selulosa. Semuanya lebih halus (melewati ayakan 200 mesh) daripada penjerap yang dipakai pada kromatografi kolom klasik dan kehalusannya sama seperti kehalusan penjerap untuk KCKT (Gritter, 1991).

Silika gel merupakan fase diam yang paling banyak dipakai dalam KLT. Karena sebagian besar silika gel bersifat sedikit asam, maka asam sering agak mudah dipisahkan, jadi meminimumkan reaksi asam basa antara penyerap dan senyawa yang dipisahkan (Gritter, 1991).

Fase gerak (pelarut, pengembang) adalah medium angkut yang terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Fase gerak yang digunakan adalah pelarut yang bermutu baik. Dalam beberapa kasus pelarut tunggal memberikan hasil yang memuaskan akan tetapi pada sebagian besar kasus pelarut tunggal menggerakkan bercak terlalu jauh untuk mengatasi hal tersebut digunakan pelarut campuran (Stahl, 1985).

Jarak pengembangan senyawa pada kromatogram biasanya dinyatakan dengan harga R_f .

$$R_f = \frac{\text{Jarak pusat dari titik awal (cm)}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

E. Keterangan Empiris

Penelitian ini bersifat eksploratif, sehingga diharapkan akan memperoleh informasi baru mengenai kemungkinan efek toksik ekstrak etanol daun waru landak terhadap *Artemia salina* Leach dan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.